

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1936

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

PAR

Jean-François BONNET

né le 3 août 1910, à Commentry (Allier)

RECHERCHES
SUR LE
DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE
DE LA
COQUELUCHE

Président : M. LEMIERRE, Professeur

PARIS

ETABLISSEMENTS BUSSON

117, RUE DES POISSONNIERS (18°)

1936

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1936

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

PAR

Jean-François BONNET

né le 3 août 1910, à Commentry (Allier)

RECHERCHES
SUR LE
DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE
DE LA
COQUELUCHE

Président : M. LEMIERRE, Professeur

PARIS

ETABLISSEMENTS BUSSON
117, RUE DES POISSONNIERS (18°)

1936

LE DOYEN : ROUSSY

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie.	ROUVIERE.
Physiologie.	Léon BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale.	DESGREZ.
Bactériologie.	Robert DEBRE.
Parasitologie et histoire naturelle médicale.	BRUMPT.
Pathologie médicale et générale.	BAUDOUIN.
Pathologie chirurgicale	CHEVASSU.
Anatomie pathologique	ROUSSY.
Histologie.	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale.	TIFFENEAU.
Thérapeutique	HARVIER.
Hygiène et médecine préventive.	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie.	LAIGNEL-LAVASTINE.
Pathologie expérimentale et comparée.	FIESSINGER.
Hydrologie thérapeutique et climatologie.	Maurice VILLARET.
Clinique médicale	LOEPER.
	CARNOT.
	CLERC.
	Marcel LABBE.
Hygiène et clinique de la première enfance.	LEREBOULLET.
Clinique des maladies des enfants.	NOBECOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux.	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	LEMIERRE.
	CUNEO.
Clinique chirurgicale	GOSSET.
	GREGOIRE.
	LENORMANT
Clinique ophtalmologique.	TERRIEN.
Clinique urologique.	MARION.
	BRINDEAU.
Clinique d'accouchements.	COUVELAIRE.
	JEANNIN.
Clinique gynécologique.	MOCQUOT.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie.	OMBREDANNE.
Clinique thérapeutique médicale.	RATHERY.
Clinique oto-rhino-laryngologique.	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale	Pierre DUVAL.
Clinique propédeutique.	SERGEANT.
Clinique de la tuberculose.	BEZANÇON.
Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte.	MATHIEU.
	HOVELACQUE.
Professeurs sans chaire.	MULON.
	OLIVIER.
	VERNE.



II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.

BENARD Henri.	Pathologie médicale.
BERNARD Et..	Pathologie médicale.
J. BEZANÇON..	Hydrologie.
BOULIN	Pathologie médicale.
BULLIARD	Histologie.
CATHALA.	Pathologie médicale.
CHEVALLIER. .	Pathologie médicale.
DOGNON.	Physique.
FEY.	Urologie.
GALLIARD.	Parasitologie.
GASTINEL	Bactériologie.
de GAUDART d'ALLAINES.	Pathologie chirurg.
GAYET	Physiologie.
GIROUD.	Histologie.
HAGUENAU ...	Pathologie médicale.
HALPHEN	Oto-rhino-laryngologie.
HAZARD.	Pharmacologie.
HUGUENIN. . . .	Anatomie pathologique.
JOANNON.	Hygiène.
LABBE (Henri) .	Chimie biologique.
LACOMME	Obstétrique.

MM.

LANTUEJOUL..	Obstétrique.
LAROCHE Guy .	Pathologie médicale.
LEMAIRE.	Pathologie expérimentale.
LEVEUF.	Pathologie chirurgicale.
Mlle J. LEVY..	Pharmacologie.
LEVY-VALENSI	Neurologie et Psychiatrie.
MOREAU	Pathologie médicale.
MOULONGUET .	Pathologie chirurgicale.
MOUQUIN.	Pathologie médicale.
OBERLING. . . .	Anatomie pathologique.
PETIT-DUTAILLIS.	Pathologie chirurgicale.
PIEDELIEVRE .	Médecine légale.
PORTES.	Obstétrique.
RICHET	Physiologie.
SANNIÈ.	Chimie biologique.
SENEQUE.	Pathologie chirurgicale.
TROISIER	Pathologie expérimentale.
TURPIN.	Pathologie médicale.
VIGNES	Obstétrique.
WILMOTH.	Pathologie chirurgicale.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE pour le service des examens

MM.

ALGLAVE	Pathologie chirurgicale.
BUSQUET	Pharmacologie.
CHAILLEY-BERT..	Physiologie.

MM.

LEROUX.	Anatomie pathologique.
NEVEU-LEMAIRE .	Parasitologie.

IV. — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE à titre permanent

MM.		MM.	
ABRAMI.	Clinique médicale.	BASSET.	Clinique chirurgicale.
ALAJOUANINE.		BROCQ.	
AUBERTIN.		CADENAT.	
BRULE.		GATELLIER.	
CHABROL.		HEITZ-BOYER	
CHIRAY		MOURE.	
DONZELOT.		QUENU	
DUVOIR.		SCHWARTZ.	
LIAN		VELTER.	
PASTEUR- VALLÉRY-RADOT			
SEZARY.			
ECALLE	Clinique obstétricale.		
GUENIOT.			
LE LORIER			
LEVY-SOLAL			
METZGER.			

V. — CHARGÉS DE COURS

MM.	
CHAILLEY-BERT, agrégé.	Education physique.
LEDoux-LEBARD.	Radiologie clinique.
WEIL-HALLE.	Puériculture.
RUFFE.	Stomatologie.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE,

A MON PÈRE,

*En témoignage de ma profonde affection
et de ma reconnaissance.*

AUX MIENS.

A MES AMIS.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LEMIERRE,

Professeur de clinique des maladies infectieuses
de la Faculté de Médecine de Paris
Membre de l'Académie de Médecine
Officier de la Légion d'Honneur

*qui a bien voulu me faire l'honneur
d'accepter la présidence de cette thèse.*

A MON MAITRE
LE DOCTEUR PIERRE-PAUL LÉVY,

Médecin à la Policlinique du Boulevard Ney .

à qui je dois le sujet de cette thèse.

Hommage respectueux et sincère gratitude.

A MES MAÎTRES DANS LES HOPITAUX.

INTRODUCTION

De toutes les infections du jeune âge, la coqueluche, l'une des plus fréquentes n'est pas la moins redoutable. Maladie anergisante, aux complications fréquentes et graves, on doit la dépister précocement, C'est de plus une maladie spécifique, donc à traiter par des moyens spécifiques. Or, il faut bien l'avouer, à l'heure actuelle, aucune des nombreuses médications proposées n'a une action constante : médicaments antispasmodiques ou modificateurs des sécrétions des bronches sont uniquement dirigés contre les symptômes ou les complications.

BORDET et GENGOU (1) en 1906, après avoir démontré la nature microbienne et décrit le germe de la maladie, préparèrent un sérum équin ; les résultats en furent peu démonstratifs. De nombreux auteurs, après eux, ont tenté la mise au point d'un vaccin, mais leurs efforts n'ont pas rencontré tout le succès désiré. En définitive, d'après leurs conclusions, identiques à celles que BORDET apporta récemment à la « Société Belge de Pédiatrie » (2), nous croyons pouvoir affirmer qu'actuellement la vaccination anticoquelucheuse, sous toutes ses formes, n'est efficace qu'au stade initial de la maladie, c'est-à-dire avant l'apparition des quintes. Elle agit aussi préventivement chez les sujets exposés à la contagion. Ainsi traité, l'enfant voit diminuer rapidement le nombre de ses quintes, les vomissements se raréfient pour cesser bientôt et l'on évite dans bien des cas les complications pulmonaires qui assombrissent le pronostic.

Il est donc très intéressant pour la prophylaxie et la thérapeutique, de pouvoir poser très tôt le diagnostic de la coqueluche. La clinique ne peut être d'aucun secours ni avant l'apparition des quintes ni dans les cas frustes ou atypiques. C'est alors que les épreuves de laboratoire acquièrent toute leur importance. Nombreuses ont été les méthodes biologiques proposées dans ce but : recherche des modifications leucocytaires, réactions de fixation du complément et d'agglutination, ensemencement sur boîtes de Pétri et enfin réactions intra-dermiques.

■

Les premières présentent peu d'intérêt pratique, n'étant positives qu'à la troisième semaine de la maladie. Nous leur consacrerons un chapitre de révision. Une seule recherche a acquis une valeur indiscutable, la culture du Bacille de BORDET-GENGOU sur milieu glyciné au sang. Très précieuse, elle n'est malheureusement pas assez répandue. Réalisable dans les grands centres, elle l'est beaucoup moins dans les petites villes et les campagnes éloignées des laboratoires spécialisés. Il serait donc très souhaitable de mettre à la disposition du praticien un test commode et sûr. A cet égard rien ne saurait égaler une intra-dermo-réaction spécifique, comparable par exemple à la réaction de SCHICK ou à l'intra-dermo-réaction tuberculinique. Ce problème nous a beaucoup tenté; après quelques auteurs nous avons essayé de le résoudre. L'intérêt principal d'une telle recherche aurait été de nous permettre d'isoler les contagieux, d'en séparer les sujets réceptifs et enfin de pratiquer la vaccination à une époque où son action pourrait être encore favorable au malade. Malgré nos efforts nous n'avons pu mettre au point une méthode satisfaisante. Cependant, après avoir consacré une partie de notre ouvrage à une revue des différents procédés actuels de diagnostic biologique de la coqueluche, nous exposerons dans le détail nos recherches et nos résultats, nos échecs. Nous avons d'ailleurs quelques raisons d'espérer; aussi nous proposons-nous de poursuivre cette étude.

Nous avons entrepris ce travail sur les conseils et sous la direction du docteur Pierre-Paul LÉVY. Pendant plusieurs années il fut notre maître à la Polyclinique du boulevard Ney. Nous le remercions de tout cœur de l'enseignement qu'il a bien voulu nous donner et sommes heureux de pouvoir lui témoigner ici toute notre reconnaissance.

La collaboration du Docteur PRÉTET, Chef de Laboratoire aux Enfants-malades, nous fut précieuse aussi. C'est lui qui nous apporta les éléments nécessaires à nos recherches : matériel, cultures, filtrats, réactions d'agglutination et de fixation. Qu'il soit certain de notre gratitude.

Mes amis POIRIER, RUBENS-DUVAL et MÉNÉTRIÉ, internes du service, m'ont été d'un grand secours. Je les prie de trouver ici mes remerciements bien sincères.

Nous envisagerons successivement :

- l'histoire de la biologie de la coqueluche.
- la technique de l'ensemencement du bacille de BORDET sur milieu glyciné au sang.
- les réactions de fixation du complément et d'agglutination.

— la réaction intra-dermique au moyen de diverses préparations microbiennes.

— l'application pratique de ces méthodes au diagnostic de la maladie.

Dans chacun de ces chapitres, nous décrirons les travaux des auteurs et les ferons suivre de nos constatations personnelles.

HISTORIQUE

Il ne s'agit plus de prouver l'authenticité du germe de la coqueluche. C'est un fait universellement admis depuis la publication mémorable de BORDET et GENGOU (1) en 1906. Ils en définirent la morphologie, en différencièrent les caractères de ceux du bacille de Pfeiffer et des autres bactéries prétendues pathogènes de la maladie. Ce sont eux qui ont pratiqué la culture du microbe sur milieu glycérimé à la pomme de terre et au sang frais défibriné. Enfin, ils en ont prouvé la spécificité par la réaction de fixation du complément. Par contre, l'agglutination dont ils firent en même temps l'essai, ne donna que des résultats inconstants.

Dix ans plus tard, en 1916, les Danois CHIEVITZ, MEYER et MAURITZEN (3) ont l'idée d'étayer le diagnostic de la coqueluche sur la recherche du bacille dans les voies respiratoires. Ils opèrent au début par prélèvement dans la gorge du patient, mais n'obtiennent ainsi aucune culture spécifique. MAURITZEN songe alors à recueillir directement sur milieu de BORDET en boîtes de Pétri les fines gouttelettes expulsées des bronches au moment d'une quinte. La méthode était créée.

GIESE (4) en 1918, nous donne une revue extrêmement complète des travaux antérieurs sur la biologie de la coqueluche : morphologie du microbe, différenciation, preuves de sa spécificité. Il insiste sur la technique de la réaction de déviation du complément et fixe l'apparition de sa positivité au deuxième septenaire de la maladie. La réaction d'agglutination au sujet de laquelle il effectua quelques essais, ne lui semble pas devoir être retenue. Le sérum de coquelucheux, en effet, agglutine aussi la bactérie de Pfeiffer.

En 1921, MADSEN (5) rapporte à la « Société de Biologie » la méthode d'ensemencement du bacille de BORDET et en 1928, DÉBRÉ, MARIE et PRETET (6) en précisent la technique exacte et montrent son utilité incontestable pour établir le diagnostic précoce de la coqueluche. A cette époque, en Amérique, KRUMWIEDE (7) décrit deux races, A

et B, de bacille de BORDET, différenciées par l'agglutination. Les recherches entreprises par DEBRÉ et ses collaborateurs, confirmées par celles de KRISTENSEN (8) démontrèrent l'unité de ces races. D'autre part, des essais effectués par MILLER, non encore publiés, montreraient à la culture l'existence de deux souches de bacilles, grise et verte : il ne semble pas exister entre elles de différences fondamentales. Notre expérience personnelle ne nous a pas permis d'établir une telle distinction.

Depuis cette période, la bactériologie de la coqueluche, n'a subi que peu de modifications. JOHN HAYS BAYLEY (9) apporte une légère retouche au milieu de BORDET : il remplace la pomme de terre elle-même par l'amidon. Les cultures seraient plus précoces et plus abondantes.

Enfin, en 1934, GUNDEL et SCHLUTTER (10), en Allemagne publient deux nouveaux moyens de différencier le bacille : culture sur milieu de KLEINSCHMIDT (11) et injection intra-dermique au lapin. Ils décrivent une technique de la réaction de fixation du complément au moyen d'un vaccin alcoolisé et lécithiné préparé d'après WITEBSKI sur le modèle de l'antigène gonococcique. Nous y reviendrons.

C'est, à notre connaissance, en 1921 que MODIGLIANI et DE VILLA (12) eurent les premiers l'idée d'appliquer au diagnostic de la coqueluche la méthode de l'intra-dermo-réaction. Encore ne firent-ils à ce moment que peu d'expériences.

Les Américains HULL et NAUSS (13) en 1923 publient leurs essais à ce sujet et citent les travaux concurremment entrepris par ORGEL (14) et RIESENFIELD (15). LUBRANO et DE VILLA (16) reprennent, à cette époque, leurs expériences avec de nouveaux vaccins.

CROPPER et JEMADAR (17), à l'occasion d'une épidémie survenue à l'école militaire royale Lawrence pratiquent des intra-dermo-réactions avec leur vaccin curatif. A la même date, MANUEL BLANC (18), en Espagne, traite les coquelucheux par vaccination intra-dermique : il ne donne que peu d'indications sur la réaction cutanée résultant de cette opération.

Enfin, en 1934, NIELS et KRARUP (19), dans un compte-rendu à la « Société Danoise de Biologie », relatent leurs expériences personnelles et font une révision des essais antérieurs. Tous ces auteurs aboutissent à une même conclusion : « Les préparations de bacilles de BORDET, injectées par voie intra-dermique ne sauraient être employées pour le diagnostic de la coqueluche ».

Nous entrerons dans le détail de ces recherches en étudiant l'intra-dermo-réaction.

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE LA COQUELUCHE

Nous envisagerons la méthode d'ensemencement du bacille de BORDET au point de vue uniquement pratique. En voici les phases successives :

PRÉPARATION DU MILIEU DE BORDET

C'est un milieu glycérimé à la pomme de terre, additionné vingt-quatre ou quarante-huit heures avant son emploi de sang frais défibriné. Pour l'obtenir, on procède ainsi :

— Mettre à feu doux, dans une capsule de porcelaine 500 gr. de pommes de terre dans un litre d'eau glycérinée à 4 % jusqu'à obtention d'une purée et retour au volume primitif (1 litre). On décante ou on passe à travers un linge fin, puis on ajoute à la partie liquide du mélange trois fois son volume d'eau salée à 6 ‰.

— D'autre part, on lave de la gélose ordinaire préalablement pesée. On l'exprime à travers une gaze et on l'incorpore à l'extrait glycériné dans la proportion de 3 %. On chauffe le tout dans une capsule, de façon à obtenir un liquide homogène.

— Le milieu ainsi préparé est filtré en autoclave ouvert sur papier Chardin ébouillanté. On répartit en petits ballons de 100 à 300 cm³ bouchés au coton cardé et on stérilise pendant un quart d'heure à 120°. Ainsi est constitué un « milieu de base » pouvant se conserver indéfiniment.

— On prélève ensuite aseptiquement du sang de cheval, de lapin, ou du sang humain que l'on défibrine en l'agitant pendant une dizaine de minutes dans un ballon stérile contenant des perles de verre. Le sang doit être frais, recueilli au maximum soixante-douze heures avant l'utilisation du milieu. Au moment de la préparation, le ballon de sang est mis dans un récipient à 40-45°. On fait fondre au bain-marie le milieu

de base et l'on attend qu'il soit revenu à une température de 45° environ. Sang et milieu de base sont alors mélangés intimement en quantités égales : on coule en boîtes de Pétri. Elles doivent être utilisées dans les quarante-huit heures qui suivent.

Certains auteurs ont insisté sur la nécessité d'atteindre un Ph déterminé. OLGA POWITZKY (20) affirme qu'un milieu de Ph 5 élimine de nombreux germes saprophytes. Malheureusement, la culture du bacille de BORDET y est aussi beaucoup plus difficile, JULIEN MARIE (21), après divers essais, adopte un Ph compris entre 7 et 7,5. En réalité, ce degré est automatiquement obtenu au moment où l'on ajoute au milieu de base une quantité égale de sang qui agit comme tampon.

D'autre part, JOHN HAYS BAYLEY (9) remplace la pomme de terre elle-même par l'amidon de la féculé. Ce changement favoriserait la pullulation des cultures spécifiques et les ferait éclore plus rapidement. Nous n'avons pas fait d'essais personnels à ce sujet.

TECHNIQUE DE L'ENSEIGNEMENT

Pour enseigner le milieu, on présente la surface sensible de la boîte de Pétri à dix centimètres environ de la bouche de l'enfant, *lors d'une quinte véritable et non provoquée*. Nous insistons sur ce fait qu'il faut recueillir les gouttelettes projetées uniquement par une quinte naturelle et non provoquée. Enseigner lors d'un accès de toux déterminé par titillation de la luette ou abaissement de la base de la langue, ne peut donner que des résultats nuls ou incertains.

Nous faisons tousser l'enfant sur trois boîtes différentes. Sur la première boîte deux secousses de toux, sur la seconde quatre, sur la troisième six. De cette façon, si le nombre de bacilles spécifiques est faible, la culture est plus riche sur la dernière boîte. Par contre, si les cultures parasites se révèlent trop nombreuses, la première boîte, moins riche en germes permet un examen plus facile. Il serait même utile d'augmenter le nombre d'ensemencements ainsi pratiqués chez un même enfant, tout en faisant varier le nombre des secousses de toux, comme nous l'avons dit plus haut. La richesse plus ou moins grande des cultures sur le milieu augmenterait les chances de succès de l'examen.

Il est bien entendu que nous ne pouvons faire ces ensemencements nous-mêmes, puisqu'il faut attendre que l'enfant ait une quinte. Les boîtes sont confiées aux parents, auxquels nous donnons les explications nécessaires. Et c'est là l'inconvénient majeur de cette méthode dont l'un des temps principaux doit être exécuté par des sujets inexpérimentés.

IDENTIFICATION DU GERME

Les boîtes de Pétri, de retour au laboratoire, sont mises à l'étuve à 37°. Un léger délai à la température ordinaire n'est pas gravement préjudiciable à la vie du microbe. Ce délai sera cependant aussi court que possible.

Pendant les deux premiers jours n'apparaissent que des colonies banales. Au cours de la deuxième journée, parfois de la troisième, on voit naître sur les parties de la surface encore vierges, de très fines colonies du diamètre de la pointe d'une aiguille, surélevées et blanchâtres. Elles atteignent rapidement un millimètre de diamètre. Elles présentent alors un aspect caractéristique qu'il suffit d'avoir vu une fois pour éviter toute confusion. Elles sont nettement arrondies et bombées. Leur circonférence est nette, régulière; vues sous une lumière oblique, elles ont une surface luisante, nacréée, un reflet métallique. L'ensemble revêt tout à fait l'apparence d'une gouttelette de mercure. Les colonies sont entourées d'un halo d'hémolyse. Peu nombreuses, 5 à 10, sur une même boîte, parfois confluentes, elles sont souvent aussi très rares. La découverte d'une seule d'entre elles, dûment identifiée, autorise le diagnostic de coqueluche. Les colonies avoisinantes sont très nombreuses mais ne prêtent vraiment à aucune confusion.

On porte dans une goutte d'eau distillée sur lame, une parcelle de la colonie à examiner. Elle est aisément prélevée par l'anse de platine et facilement émulsionnée sur la lame. Au contraire, des colonies microscopiquement semblables, telles que celles du *micrococcus catarrhalis* fuient devant l'instrument qui cherche à les capturer, en glissant sur la surface de la gélose, et se laissent difficilement étaler.

Le microbe de BORDET-GENGOU est un coccobacille immobile, ovoïde, de un à deux μ de longueur, un tiers de μ de largeur. Il a la forme d'une navette et présente assez souvent un groupement analogue à celui des diplocoques. D'autres fois, il s'agglomère en petits amas. Après repiquages successifs sur milieu de BORDET, il diminue de grandeur et devient cocciforme. Il récupère son aspect primitif par passage sur milieu liquide puis solide. Il est strictement aérobic.

Il ne prend pas le Gram. Au violet de gentiane il faut préférer, pour le colorer, le bleu phéniqué de Kühne, ou mieux encore le bleu de toluidine suivant la formule de BORDET et GENGOU :

Bleu de toluidine.....	5 gr.
Alcool	100 cm ³
Eau	500 cm ³

Après dissolution complète, on ajoute 500 gr. d'eau phéniquée à 5 %, puis on filtre vingt-quatre heures plus tard. Cette coloration met bien en évidence sa forme en navette : espace clair central, teinte plus foncée sur ses bords et aux extrémités.

Cette morphologie du bacille de BORDET est tout à fait semblable à celle de la bactérie de Pfeiffer. Ni la taille, ni la forme ne permettent de différencier les deux germes. Il importe donc de les transporter sur des milieux d'identification. Nombreux sont ceux qui ont été proposés dans ce but. En pratique, les seuls employés sont : le milieu de BORDET, la gélose au sang, la gélose ascite.

— Sur milieu de BORDET, le repiquage donne après trois ou quatre jours des colonies semblables aux premières. Nous avons vu qu'après plusieurs passages, le microbe s'amointrit jusqu'à devenir cocciforme. Pour faciliter l'identification du germe, on peut ensemençer du bacille de BORDET à côté du microbe à reconnaître et comparer l'aspect des deux colonies au bout de trois ou quatre jours.

— Le meilleur milieu d'identification et de conservation des souches est, sans conteste, la gélose au sang. Elle est constituée par de la gélose ordinaire à laquelle on incorpore 30 % de sang frais défibriné. En quarante-huit heures, les colonies forment à sa surface une mince strie blanche qui s'épaissit par la suite.

KLEINSCHMIDT (II) additionne la gélose au sang de 2 % de glucose. Le bacille de BORDET y donne en soixante-douze heures des colonies grisâtres, hémolysantes, alors que la bactérie de Pfeiffer ne provoque la formation que de colonies transparentes, rares et sans action sur l'hémoglobine. On peut conserver indéfiniment le bacille de BORDET sur ces deux milieux en le repiquant toutes les cinq à six semaines.

L'une des caractéristiques du bacille est de pouvoir s'adapter aux milieux privés de sang dès le deuxième ou troisième passage. La bactérie de Pfeiffer n'y pousse jamais. On obtient ainsi, sur gélose ascite ou sur sérum coagulé, des colonies d'un blanc jaunâtre poussant lentement en quatre à sept jours et qui s'épaississent plus tard.

D'autres milieux ont été décrits pour la culture du bacille de BORDET : le milieu de LEGROUX, à l'amidon de pomme de terre ; il a l'avantage de faire pousser les microbes dès le premier repiquage en trois ou quatre jours sans qu'il soit besoin d'ajouter de sang. Le milieu chocolat des Américains n'est autre qu'une gélose au sang cuit : le microbe n'y pousse pas au premier passage.

L'an dernier GUNDEL et SCHLUTTER (10) ont proposé une autre méthode pour la différenciation du bacille de BORDET. Ils font au lapin une injection intra-dermique avec une émulsion contenant par centimètre cube cinq milliards des germes à l'étude. Au bout de vingt-quatre

heures, il se forme un élément papulo-nécrotique au niveau du point d'injection, s'il s'agit bien du bacille de BORDET. L'émulsion de bacilles de Pfeiffer ne donne aucune réaction.

Il existe enfin un dernier moyen de prouver la spécificité du bacille trouvé dans les boîtes de Pétri : l'agglutination. Celle-ci peut être faite rapidement en émulsionnant une colonie dans une goutte de solution physiologique à laquelle on ajoute du sérum expérimental dilué du 1/100^e au 1/1.000^e. On observe macroscopiquement et microscopiquement la réaction. Nous reviendrons plus loin sur la technique et les résultats de l'agglutination.

Voilà donc une première méthode biologique de diagnostic de la coqueluche. Précocement positive, avant l'apparition des quintes, d'exécution facile, elle a une valeur indiscutable : correctement effectuée, la recherche du bacille est pour ainsi dire toujours positive dans la période de début de la maladie cliniquement indémontrable qui s'étend du cinquième au quinzième jour. Elle reste positive jusqu'au vingtième jour. Après cette époque, elle perd beaucoup de sa valeur qui devient nulle à la quatrième ou cinquième semaine, date à laquelle on ne retrouve plus aucun bacille à l'ensemencement, ce qui explique l'absence de contagiosité de la coqueluche aux environs de la quatrième semaine. D'ailleurs, après l'apparition des quintes, l'intérêt de cette recherche est beaucoup moindre. Nous l'avons employée pour la plupart de nos petits malades : elle s'est montrée fidèle ; nous avons pu la contrôler par l'apparition des quintes et par la réaction de fixation. Elle nous a permis presque toujours de trancher un diagnostic hésitant.

Cependant, nous avons eu parfois quelques difficultés à obtenir cet examen en raison, soit du peu de soin que prenaient nos malades des boîtes de Pétri, soit de la mauvaise technique avec laquelle ils effectuaient l'ensemencement. En effet, il existe deux inconvénients : l'exécution de l'ensemencement par des sujets non expérimentés, la fragilité du milieu. Cette fragilité le rend difficilement transportable et malheureusement trop peu de laboratoires à l'heure actuelle sont en mesure de faire cette recherche sur place. Au Danemark, pour faciliter le transport, on utilise des boîtes de Pétri en aluminium : innovation intéressante mais qui n'empêche en rien l'altération du milieu lui-même pendant le trajet.

Quoi qu'il en soit, l'ensemencement du bacille de BORDET sur boîtes de Pétri constitue une précieuse ressource pour le diagnostic précoce de la coqueluche. Nous souhaitons vivement qu'elle se répande de plus en plus car c'est là le seul moyen pratique de diagnostic avant l'apparition des quintes.

RÉACTIONS D'AGGLUTINATION ET DE FIXATION DU COMPLÈMENT DANS LA COQUELUCHE

Il n'est pas dans notre intention d'étudier en détail les réactions d'agglutination et de fixation du complément. Leur technique délicate, la longueur des manipulations en font des méthodes d'exception. Cependant nous passerons rapidement en revue chacune d'elles et verrons quelles conclusions nous pouvons tirer de la mise en œuvre de ces procédés.

I. — Réaction d'agglutination

BORDET et GENGOU (1), après leur découverte, cherchent à prouver la spécificité du bacille par l'agglutination. Ils préparent une émulsion, dans deux à trois centimètres cubes de sérum physiologique, de colonies développées en deux jours sur gélose au sang, d'une concentration de deux milliards de germes par centimètre cube environ. Puis ils injectent au cheval tous les deux ou trois jours, suivant la réaction, cent centimètres cubes du mélange : au total, quinze injections, soit un volume de deux litres et demi de vaccin. Les anticorps apparaissent au bout d'un mois environ et l'immun-sérum ainsi obtenu peut agglutiner une émulsion microbienne jusqu'au 1/5.000°. GIESE (4), en 1918, reprend ces travaux. KRUMWIEDE (7), en 1923, agglutine des bacilles de BORDET avec un sérum de lapins immunisés. C'est ainsi qu'il découvre deux souches de bacilles, A et B, chacune étant agglutinable par le sérum homologue et non agglutinable par le sérum hétérologue. JULIEN MARIE (21) signale dans sa thèse des recherches analogues. Il immunise des lapins en pratiquant vingt injections intra-veineuses d'une émulsion de deux milliards de germes par centimètre cube. Il procède par séries de cinq injections séparées par quatre jours d'intervalle. La quantité de vaccin employé varie entre 0 cc. 5 et 1 cc. 5; injecté au début après chauffage à 50°, il est employé pur après les

premières séries. D'autre part, deux immun-sérums A et B lui avaient été fournis par les Américains. La technique même de l'agglutination est très simple : elle consiste à laisser trois heures à 37°, puis quatre heures à la température du laboratoire un mélange de 1 cc. d'émulsion bactérienne avec des dilutions d'immun-sérum de 1/100^e à 1/5.000^e.

Les investigations de nombreux auteurs ont montré que le pouvoir antigène du Bacille de BORDET diminuait très rapidement. L'agglutination effectuée sur une même souche de bacilles, mais à plusieurs mois de distance, donne des résultats fort différents : très nette lorsque la souche est récente, elle est beaucoup moins caractéristique lorsque la souche servant d'antigène a été entretenue dix à douze mois au laboratoire par repiquages successifs. L'agglutination ne se produit plus alors qu'à un taux de dilution très faible du sérum.

L'agglutination, test d'authentification d'une souche de bacilles au moyen d'un immun-sérum expérimental, est donc une méthode fidèle. Il importe toutefois que l'immun-sérum ait été préparé depuis peu et que les bactéries servant d'antigène, aient été récemment isolées de l'organisme. Signalons que ni KRISTENSEN (8), ni JULIEN MARIE, n'ont pu retrouver de souches microbiennes agglutinables par le sérum A américain : au contraire, toutes les souches observées étaient agglutinées par le sérum B. L'existence de deux races différentes, A et B, basée uniquement sur des recherches d'agglutinabilité, n'est donc nullement démontrée.

Nous avons eu rarement recours à l'agglutination pour vérifier la spécificité des microbes en provenance de nos petits malades. Mais toutes les fois que nous avons fait cet examen nous avons obtenu une excellente agglutination pour un taux de dilution de 1/5.000^e d'immun-sérum.

Beaucoup plus infidèles sont les recherches tendant à authentifier un sérum de coquelucheux par son pouvoir agglutinant vis-à-vis d'un antigène constitué par une souche de bacilles de BORDET. BORDET et GENGOU, CHIEVITZ et MEYER (3), GIESE, JULIEN MARIE sont très réservés sur ce point. La réaction est en effet très inconstante, le taux d'agglutination extrêmement variable et souvent très faible, enfin quelquefois la bactérie de Pfeiffer serait agglutinée par le sérum de coquelucheux. A ce point de vue, la méthode présente donc peu d'intérêt pour le diagnostic tardif de la coqueluche.

Voici, en dernier lieu les résultats des recherches de J.-J. MILLER (22). Il injecte une série de lapins avec un vaccin phénolé, une autre série avec une endotoxine obtenue en congelant puis chauffant une émulsion de bacilles. Il constate que cette dernière préparation provoque plus rapidement dans le sérum la formation d'anticorps que

le vaccin phénolé et conclut que les substances antigènes de bacille de BORDET sont relativement thermostables tandis que ses toxines sont inactivées à 37°.

Si toutefois ces données ne résolvent pas le problème de l'agglutination, du moins peuvent-elles être d'un utile secours pour la préparation des vaccins, le pouvoir vaccinant étant dans une certaine mesure parallèle au pouvoir antigène. Nous exigeons donc d'un vaccin non seulement que sa date de préparation ne soit pas trop éloignée du jour où il doit être utilisé, mais surtout que les souches employées à son élaboration, aussi nombreuses que possible, proviennent de microbes récemment isolés de l'organisme, et que la préparation soit effectuée par chauffage plutôt que par addition de substances chimiques antiseptiques.

II. — Réaction de fixation du complément

Si la réaction d'agglutination dans la coqueluche est de faible valeur diagnostique, il n'en est pas de même de la réaction de fixation du complément. C'est cette réaction même que découvrirent BORDET et GENGOU, qui leur permit de prouver l'authenticité du germe incriminé par eux. Tous les auteurs qui, dans la suite, étudièrent le bacille de BORDET, se sont astreints à le contrôler par cette méthode. Ils ont montré la constance des propriétés du sérum de coquelucheux vis-à-vis du bacille et l'absence de toute réaction semblable vis-à-vis des races voisines. GIESE fixe sa date d'apparition au deuxième septenaire de la maladie. La réaction augmente à la troisième semaine pour atteindre son maximum à la fin du deuxième mois, puis diminue. Elle est constante pendant ce laps de temps dans tous les cas, et peut persister plusieurs années après l'infection; on l'a retrouvée ainsi chez 50 % d'anciens coquelucheux.

Récemment, WILHEIM BAYER (23) a effectué la réaction de fixation chez cent soixante-neuf enfants atteints de coqueluche. Sur dix-sept sujets âgés de moins de trois mois, la réaction a été négative. Elle l'a été six fois sur onze enfants âgés de quatre à six mois. A partir de cet âge la réaction de fixation est toujours positive chez les coquelucheux. Dans la première semaine, on a trouvé deux réactions négatives sur trente-cinq cas; dans la troisième semaine trois réactions négatives sur trente-huit cas et entre la quatrième et la neuvième semaine, les cent cinquante-huit cas ont montré une réaction positive plus ou moins forte qui persiste assez peu de temps après la maladie. La vaccination ne provoque pas la formation d'anticorps chez le nourrisson. Elle n'en fait apparaître chez les enfants plus grands qu'au bout de cinq semaines : il faudrait donc injecter le vaccin pendant la période d'incu-

bation ; il serait inutile de vacciner le nourrisson. BAYER conclut, tout en suspectant la spécificité du bacille de BORDET-GENGOU, à l'utilité de la réaction de fixation dans les coqueluches frustes et atypiques. Au point de vue épidémiologique, de même, il est intéressant de l'exécuter : l'auteur, en effet, a constaté que chez un médecin et dix infirmières en contact avec les coquelucheux, la réaction était négative, tandis qu'elle se montrait positive chez la plupart des parents des malades. Cela tendrait à démontrer qu'un contact prolongé avec le germe expulsé par les enfants, confère aux personnes de l'entourage une immunité active, avec production d'anticorps dans l'organisme, et justifierait l'emploi du sérum des parents pour prévenir la coqueluche des jeunes sujets.

La technique est celle de toute réaction de fixation. L'antigène est constitué par une émulsion de bacilles de BORDET d'une concentration de deux milliards de germes par centimètre cube. Les microbes sont prélevés le jour même et proviennent du râclage de cultures de quarante-huit heures, de souches différentes, sur gélose au sang.

Nous avons fait effectuer cette réaction avec le sérum de nos malades : elle a été positive chaque fois.

Pour réduire la durée de la recherche, M. PRETET, qui a bien voulu se charger des manipulations a essayé de simplifier la technique. Les résultats n'ont pas été satisfaisants et la tentative est demeurée sans lendemain.

GUNDEL et SCHLUTTER (10) emploient concurremment deux antigènes :

1° Un « vaccin original » : émulsion de huit milliards de germes par centimètre cube (râclage de cultures de quarante-huit heures sur gélose-sang) additionnée d'acide phénique dans la proportion de 0,5 % et chauffée une heure à 60°.

2° Émulsion dans l'alcool, de même concentration que la précédente, additionnée de 0 cc. 1 d'une solution de lécithine à 1/100°.

Pour effectuer la réaction, ils mettent en présence :

- 0 cc. 1 de sérum à différentes dilutions,
- 0 cc. 1 de vaccin dilué à 1/10°,
- 0 cc. 1 d'alexine diluée à 1/20°.

On porte à l'étuve une heure à 37°. On utilise comme témoin le sérum de malades atteints de blennorragie. Les auteurs ont constaté que :

- avec le vaccin original on n'obtenait pas de réaction spécifique ;
- avec le vaccin alcoolisé et lécithiné on obtenait la réaction même après un séjour de une heure à 0°.

Cette réaction a été positive dans la plupart des cas. Plus courte que la méthode classique, elle nous paraît préférable. Nous ne l'avons pas encore utilisée, mais nous avons l'intention d'y avoir recours pour nos prochains essais.

En résumé, quelle qu'en soit la technique, la réaction de fixation du complément établit sûrement un diagnostic de coqueluche. Mais elle apparaît à une période tardive; elle est de réalisation longue et délicate. A ce titre, elle doit être considérée comme un moyen d'études théoriques et ne saurait prétendre à passer dans la pratique courante.

RÉACTIONS INTRA-DERMIQUES DANS LA COQUELUCHE

Nous avons essayé de mettre au point, dans nos recherches sur le diagnostic biologique de la coqueluche, une réaction cutanée par injection intra-dermique d'un antigène coquelucheux. Serait-elle semblable à la réaction de VON PIRQUET pour la tuberculose, démontrant l'état d'allergie vis-à-vis du microbe en cause Ou bien, à l'instar de la réaction de SCHICK, prouverait-elle l'état de réceptivité des enfants examinés? Nous n'avions aucune idée préconçue sur son mode d'action. Notre but était de pouvoir dépister les sujets réceptifs en période d'épidémie et surtout de les vacciner préventivement. En effet, c'est surtout à titre préventif qu'agit le vaccin coquelucheux : CHEIVITZ et MEYER (3), KRISTENSEN (25) estiment qu'une vaccination pratiquée quelques semaines avant l'invasion, est capable d'empêcher l'apparition de la coqueluche ou tout au moins de l'écourter et d'en atténuer la gravité. En période d'invasion ou pendant la période catarrhale, les effets en sont beaucoup moins satisfaisants. Il est donc d'une grande importance et au point de vue prophylactique et au point de vue thérapeutique de pouvoir poser avec certitude le diagnostic de coqueluche, à un stade où toute autre recherche de laboratoire est encore muette.

Nous avons cité au début de cet ouvrage les auteurs qui ont pratiqué de semblables essais. Voici le résumé de leurs travaux :

MODIGLIANI et DE VILLA (12), en 1921, publient une nouvelle méthode, permettant, d'après eux, de diagnostiquer soit une coqueluche en son début, soit l'état de réceptivité des enfants en contact avec des sujets atteints de coqueluche. Ils injectent dans le derme un autolysat de cultures de bacilles de BORDET-GENGOU et constatent, au bout d'un certain temps, l'apparition d'une réaction inflammatoire au niveau de l'injection. La réaction se montrait négative chez les enfants sains; elle était positive chez plusieurs enfants exposés à la contagion: ceux-ci

présentèrent effectivement une coqueluche typique quelques jours après.

ORGEL (14), en 1922, pratique chez trente-cinq enfants coquelucheux à différents stades de la maladie, des cuti-réactions et des injections intra-dermiques. Il se sert d'une émulsion de deux milliards de bacilles de BORDET dans un centimètre cube de sérum physiologique. Tous les sujets sauf un, eurent une réaction positive, ce dernier étant au début de sa maladie. La réaction apparaît trois heures après l'injection; l'induration persiste environ huit jours.

RIESENFIELD (18), en 1923, injecte dans le derme de quatre cent soixante-quatre enfants des émulsions, toxines ou autolysats, de concentration différente : 4, 8, 16, 32 milliards de germes par centimètre cube, inactivés par la chaleur. Il fait une injection témoin de sérum physiologique. Les réactions obtenues furent assez déroutantes. Chez cent douze enfants apparemment immunisés, c'est-à-dire exposés à la contagion et non contaminés par la suite, la réaction s'est montrée positive soixante-deux fois.

Aussi infidèles furent les résultats publiés la même année par HULL et NAUSS (13). Ils firent, pendant une épidémie de coqueluche, trois cent quarante et une injections de préparations diverses : émulsions fraîches de microbes tués, soit par la chaleur soit par un agent chimique (tricrosöl), ou préparations identiques mais âgées de trois semaines. Le témoin employé était une émulsion de bacilles de Pfeiffer. Les réactions positives obtenues avaient leur maximum en cinq heures et disparaissaient en quarante-huit heures. Presque tous les enfants eurent une réaction positive tandis que des coquelucheux montraient une réaction négative.

LUBRANO et DE VILLA (16), en 1929, semblent avoir obtenu des résultats plus précis. Ils font des injections intra-dermiques avec une émulsion de bacilles de BORDET dans l'eau distillée. La réaction apparaît positive aux différents stades de la maladie et chez des enfants guéris depuis peu de mois; elle est négative chez tous les sujets d'un groupe témoin et chez des enfants guéris depuis un an et plus.

En 1932, en Espagne, Manuel BLANC (18) traitait les coquelucheux par vaccination intra-dermique, le vaccin étant constitué par une émulsion dans 1 cc. de sérum physiologique, de cinquante millions à un milliard de germes. Il signale la possibilité d'une réaction locale, d'autant plus forte que la guérison est plus rapide, mais n'en a pas étudié l'application au diagnostic de la coqueluche.

CROPPER et JEMADAR (17), à l'occasion d'une épidémie de coqueluche survenue en 1923 au « Lawrence Royal Military School » à Sannawar, ont fait à leurs malades des injections intra-dermiques. Ils employaient une dilution de 0 cc. 02 de vaccin curatif dans 0 cc. 2 de

sérum physiologique ; le témoin était constitué par cette même préparation chauffée dix minutes à 75°. Ils ont traité deux groupes d'enfants dont l'âge variait entre quatorze et seize ans.

— 1^{er} groupe : vingt-six enfants ayant eu la coqueluche, donc théoriquement immunisés.

— 2^e groupe : trente-trois enfants n'ayant pas eu cette maladie, donc théoriquement réceptifs.

Ils ont observé, dans le premier groupe, six réactions positives, dans le deuxième groupe neuf ; les autres réactions furent inférieures ou égales à la réaction témoin. En outre, ils ont injecté une nouvelle série de cinq enfants âgés de 3 à 7 ans et récemment guéris : quatre d'entre eux eurent une réaction négative, le cinquième une réaction très légère. Les auteurs concluent qu'il est impossible d'appliquer à l'étude de la coqueluche une réaction analogue à celle de SCHICK pour la diphtérie.

En dernier lieu, en 1935, NIELS et KRARUP (19) publient à la « Société Danoise de Biologie » leurs propres recherches. Ils préparent des vaccins à partir de souches grises et vertes de bacilles de BORDET :

— Préparation n° 1 : émulsion de six souches grises dans de l'eau salée, additionnée de 0,5 de phénol.

— Préparation n° 2 : même émulsion avec six souches vertes.

— Préparation n° 3 : autolysat constitué par une émulsion de six souches grises dans l'eau distillée avec 0,5 % de phénol ; séjour de trois jours à 37°, deux jours à la glacière puis un jour à 37°. Lors de la congélation, les bactéries se rassemblent en gros grumeaux. Ceux-ci sont séparés par centrifugation et on ajoute à la préparation une solution concentrée de NaCl jusqu'à obtention d'un taux de 0,9 %.

— Préparation n° 4 : autolysat préparé avec six souches vertes de la même manière que le précédent.

La teneur microbienne de ces solutions est mesurée par comparaison avec un coli-vaccin de deux milliards de bactéries par centimètre cube. Le témoin employé est une solution de 0,9 % de NaCl + 0,5 % de phénol. Il fut pratiqué cent quatre-vingt-dix injections réparties entre trente-neuf sujets divisés en trois groupes ; chaque injection était de 1/25 cc. et les lectures faites vingt-quatre, quarante-huit, soixante-douze heures après l'injection.

Groupe n° 1 : comprend quatorze enfants âgés de un à dix ans et un adulte de vingt-cinq ans, n'ayant jamais eu la coqueluche. Presque tous eurent une réaction positive nette, plus forte chez les enfants que chez l'adulte, plus forte aussi avec les émulsions qu'avec les autolysats, tant avec les souches grises qu'avec les souches vertes.

— *Groupe n° 2* : est constitué par treize enfants et deux adultes ayant eu la coqueluche depuis un temps plus ou moins long. Les résultats furent tout aussi confus que ceux du groupe n° 1 ; en particulier, certains sujets guéris depuis longtemps montraient une réaction plus accentuée que d'autres relevant à peine de maladie. Là encore les émulsions donnèrent des réactions plus intenses que les autolysats.

— *Groupe n° 3* : comprend huit enfants de un à six ans, coquelucheux à la période d'état. Les réactions furent tout à fait comparables à celles des groupes précédents, sans différence pour les souches grises et les souches vertes.

Le antigènes sont alors dilués à 1/10° et injectés. Les résultats ne sont pas plus démonstratifs et les auteurs écrivent : « Bien que le nombre des sujets observés ait été fort restreint, nous croyons être autorisés à conclure que les préparations de bacilles de la coqueluche, injectées par voie intra-cutanée, ne provoquent pas de réactions spécifiques et ne sauraient être employées pour le diagnostic. Il n'y a pas de réaction spécifique respectivement à l'égard des souches bacillaires grises et vertes de la coqueluche et la tentative faite pour spécifier de la sorte le matériel témoin utilisé, n'a apporté aucune amélioration à la méthode. »

ESSAIS PERSONNELS

Nos recherches ont été poursuivies à la Policlinique du boulevard Ney pendant la recrudescence de coqueluche de l'hiver 1934-35. Les enfants, de tous âges, sont classés en trois groupes.

Groupe n° 1 : sujets en cours de coqueluche, à la période catarrhale ou à la période des quintes ; diagnostic de certitude par la clinique confirmé biologiquement par ensemencement sur boîtes de Pétri ou plus tard par réaction de fixation.

Groupe n° 2 : enfants n'ayant jamais eu la coqueluche et ne l'ayant pas contractée au cours de l'épidémie.

Groupe n° 3 : enfants ayant eu antérieurement la coqueluche.

Les antigènes injectés ont tous été préparés par M. PRÉTET. Voici leur composition :

1° *Bouillons filtrés* : cultures sur bouillon ascite de bacilles de BORDET-GENGOU, maintenues à l'étuve respectivement dix, quinze, vingt, trente jours, puis centrifugées et filtrées sur bougies Chamberland L. 3. Nous les avons dénommées suivant leur temps de séjour à l'étuve : B 10, B 15, B 20, B 30.

2° *Emulsion* dans l'eau distillée de microbes provenant du râclage de cultures sur gélose au sang. La concentration est de dix milliards de germes par centimètre cube.

3° *Lysats vaccins* :

a) *Lysat sulfurique ou lysat n° 1* : obtenu par action ménagée de l'acide sulfurique à chaud sur une émulsion de cinq milliards de germes par centimètre cube, puis neutralisée au carbonate de chaux et filtrée. Ce liquide est riche en acides aminés.

b) *Lysat n° 2* : préparé en soumettant une émulsion microbienne de cinq milliards de germes par centimètre cube à une température

de 0° pendant huit jours, puis de 37° pendant quatre jours, enfin de 22° pendant dix jours.

Au début, nous nous sommes assurés de la parfaite innocuité des antigènes en utilisant des dilutions d'abord extrêmement faibles puis graduellement croissantes. Tous ces antigènes ont été essayés sur nous-mêmes avant leur injection à nos petits malades. Jamais leur introduction dans le derme n'a provoqué ni de phénomènes généraux (élévation de température, malaises, nausées), ni de réaction ganglionnaire au niveau de l'épitrochlée ou de l'aisselle; à peine a-t-on pu noter dans les formes très marquées un léger prurit in situ, sans douleur spontanée ni provoquée.

Nous avons employé ces préparations à l'état pur dans plus de la moitié des cas. Puis, estimant la réaction qu'ils donnaient, trop constante aussi bien chez des sujets en cours de coqueluche que chez des sujets sains, nous avons étudié l'effet de dilutions à 1/10°, 1/50°, 1/100°, 1/300° en sérum physiologique.

Une réaction témoin fut faite à la plupart de nos enfants avec les mêmes préparations chauffées à 100° pendant 15 minutes. Plus tard, nous avons utilisé, pour les bouillons filtrés, le bouillon ascite vierge, pour les lysats, le sérum physiologique.

Nous injections au même sujet deux antigènes différents afin d'apprécier concurremment leur action respective. La technique de l'injection ne diffère en rien de celle de la réaction de SCHICK : injection intra-dermique à la partie supérieure et externe de l'avant-bras, de 1/10° de cc. de produit actif.

Nos résultats sont résumés dans les tableaux suivants : l'âge de l'enfant et la période de sa maladie, ou l'âge auquel il l'a eue, y sont notés. Nous avons adopté pour figurer l'intensité des réactions, les signes suivants :

O, réaction nulle,

+, réaction légèrement papuleuse, rose, assez bien limitée, peu indurée, de la dimension d'une pièce de 0 fr. 50,

++, réaction plus fortement papuleuse, bien limitée, rouge, de la dimension d'une pièce de un à deux francs, reposant sur une base légèrement indurée,

+++, réaction très papuleuse, à base fortement indurée, rouge brunâtre, très bien limitée, entourée d'une zone congestive, de la dimension d'une pièce de deux à cinq francs.

Groupe N° 1

ENFANTS EN COURS DE COQUELUCHE

2 R. Méline = 0.
2 R. au bouillon chauffé

	DILUTIONS	B. 1/50	B. 1/100	B. 1/300	B. 15	TÉMOIN	
Rolande A.	4 ans	+	+	+	+	+	+
Simone S.	4 ans	+	+	+	+	+	+
Raymonde S.	2 ans	+	+	+	+	+	+
Simone H.	4 ans	+	+	+	+	+	+
Jean S.	4 ans	+	+	+	+	+	+
Emilienne S.	5 ans	+	+	+	+	+	+
André B.	5 ans	+	+	+	+	+	+
Madeline S.	1 an	+	+	+	+	+	+
René S.	5 ans	+	+	+	+	+	+
Antoinette S.	6 ans	+	+	+	+	+	+
Armand S.	5 ans	+	+	+	+	+	+
René B.	1 an	+	+	+	+	+	+
Pierre B.	2 ans	+	+	+	+	+	+
Yvette B.	6 ans 1/2	+	+	+	+	+	+
Marcelle B.	9 ans	+	+	+	+	+	+
Ida S.	1 an	+	+	+	+	+	+
Louis G.	4 mois	+	+	+	+	+	+
Edith B.	1 an 1/2	+	+	+	+	+	+
Serge S.	1 an	+	+	+	+	+	+
Louis G.	4 mois	+	+	+	+	+	+
Georges L.	3 ans	+	+	+	+	+	+
Jeanne L.	5 ans	+	+	+	+	+	+
Christiane G.	1 an 1/2	+	+	+	+	+	+
Jeanine G.	22 mois	+	+	+	+	+	+
Pedro A.	4 ans	+	+	+	+	+	+
Gustave O.	4 ans	+	+	+	+	+	+
Georges L.	3 ans	+	+	+	+	+	+
Jeanne L.	5 ans	+	+	+	+	+	+
Marcel H.	7 mois	+	+	+	+	+	+
José G.	4 ans 1/2	+	+	+	+	+	+
Amélie G.	3 ans	+	+	+	+	+	+
Berthe P.	2 ans 1/2	+	+	+	+	+	+
Jacques D.	7 mois	+	+	+	+	+	+
Odette D.	7 mois	+	+	+	+	+	+
Monique M.	3 ans	+	+	+	+	+	+
Michelle S.	2 ans	+	+	+	+	+	+

ENFANTS AYANT EU LA COQUELUCHE

NOMS	AGE	DATE DE LA COQUELUCHE	B. 10	B. 15	B. 20	B. 30	TÉMOIN	OBSERVATIONS
Raymond L.	12 ans	6 ans	0					
Jeanine B.	8 mois	4 ans	0					
Yves B.	22 mois	1 an		+				
Mauricette H.	8 mois	6 mois		+				
Marc H.	4 ans	3 ans		+				
Yvonne N.	12 ans	6 ans		+				
Fernande M.	6 ans	4 ans		+				
Odette N.	7 ans	3 ans		0				
Irène B.	10 ans	9 ans		+			+	
Denise G.	5 ans	4 ans		+			+	
Sarah L.	8 ans	2 ans		+			+	
Béline L.	4 ans	2 ans		0			0	
Gilbert B.	6 ans	5 ans		+			0	
Lucie S.	5 ans	4 ans		+			0	
Suzanne G.	7 ans	5 ans		+			0	
Georges F.	3 ans	2 ans					0	
Abel D.	5 ans	3 ans					0	
Paul S.	13 ans 1/2	3 ans					0	
							+	
							0	
							0	

[illegible]

RÉSULTATS DES INTRA-DERMO-RÉACTIONS FAITES AVEC LES LYSATS-VACCINS PURS ET DILUÉS.

Groupe N° 1

ENFANTS EN COURS DE COQUELUCHE

NOMS	AGE	PÉRIODE DE LA COQUELUCHE	ÉMULSION	LYSAT N° 1	LYSAT N° 2	TÉMOIN	OBSERVATIONS
Suzanne L.	5 ans	2 ^e sem.		++ +			R. ecchymotique + forte que pour B. 15. d° d° d°
Antoinette N.	2 ans	1 ^{re} —	+	+			
Marcel L.	2 ans	2 ^e —		+			
Roger L.	3 mois	1 ^{re} —		+			
Paulette M.	2 ans	1 ^{re} —		+			
Adenito B.	3 mois	2 ^e —		+			
Hélène M.	5 ans	3 ^e —		+			
Ginette P.	5 ans 1/2	4 ^e —	++ +	+	+		R. « Méline » = 0. R. = +++ pour B. 30.
Monique P.	2 ans	1 ^{re} —		+	+		
Rolande A.	3 ans 1/2	2 ^e —		+	+		
André B.	5 ans	1 ^{re} —	++ +	+	+		R. + forte que pour B. 30.
Madeleine S.	1 an	1 ^{re} —		+	+		R. + forte que pour B. 20. R. ecchymotique + forte que pour B. 20 et B. 30.
Armand S.	5 ans	2 ^e —			+	+	
Armand S.	5 ans	5 ^e —			+	+	
Marcelle S.	6 ans	1 ^{re} —			+	+	
Marcelle S.	6 ans	2 ^e —			+	+	
Pierre B.	6 ans 1/2	5 ^e —			+	+	
Michelle B.	2 ans	1 ^{re} —		+			
Marcelle B.	9 ans	1 ^{re} —		0	0	0	R. = 0 pour B. 20 R. = + pour B. 20. d°
Marcelle B.	9 ans	2 ^e —		0	0	0	
Ida S.	1 an	2 ^e —	++ +	+	+	+	
Louis G.	4 mois	2 ^e —	++ +	+	+	+	
Edith B.	1 an 1/2	2 ^e —	++	+	+	+	
Serge S.	1 an	2 ^e —	++		+	+	
Georges L.	3 ans	1 ^{re} —			+	+	
Jeanne L.	5 ans	4 ^e —			+	+	
Christiane G.	3 ans	1 ^{re} —	++ +		+	+	
Jeanne G.	1 an 1/2	1 ^{re} —			+	+	
Pedro A.	22 mois	2 ^e —			+	+	R. « Méline » = 0.

DILUTIONS			LYSAT 1/10	LYSAT 1/50	LYSAT 1/100	LYSAT 1/300	
Edith B.	1 an 1/2	2 ^e sem.	+				Lys. 1/10 + fort que Ly-
Georges L.	3 ans	3 ^e —	+				sat pur.
Jeanne L.	5 ans	4 ^e —	+				
Christiane G.	3 ans	1 ^{re} —	+	+			
Jeanine G.	1 an 1/2	1 ^{re} —	+	+			
Pedro A.	2 ans	2 ^e —	+	+			
Marcos H.	5 ans	4 ^e —	+	+	0	0	
Louis B.	10 ans	3 ^e —	+	+	+	+	
Louis B.		4 ^e —	+		0	0	
Hélène O.	3 ans 1/2	3 ^e —	+		0	0	
Pierre D.	3 ans 1/2	6 ^e —	+		0	0	R. 2 fois répétées : incons-
Willy M.	2 ans 1/2	2 ^e —	+		+	0	stantes.
Odette M.	8 mois	3 ^e —	+		0	0	
José G.	7 mois	1 ^{re} —		+	0	0	
Jeanine M.	1 an	1 ^{re} —			0	0	
Amélie G.	4 ans 1/2	3 ^e —			0	0	R. 3 fois répétées : 3 fois
Berthe P.	3 ans	3 ^e —		+	0	0	negatives.
Jacques D.	2 ans 1/2	6 ^e —	+	+	0	0	d ^o
Charlotte D.	7 mois	4 ^e —	+	0	0	0	R. 4 fois répétées : cons-
Monique M.	3 ans	1 ^{re} —			0	0	tantes.
Monique M.	3 ans	2 ^e —			+	+	R. 2 fois répétées : diver-
Michelle S.	2 ans	1 ^{re} —			0	0	gentes.
Simone B.	8 mois	2 ^e —		0	+	+	R. 3 fois répétées : iden-
Cécile P.	5 ans	2 ^e —	+	+	+	0	tiques.
René M.	2 ans	2 ^e —	+	0	+	0	R. répétées : divergentes.
Roland M.	2 ans	2 ^e —	+	+	+	0	R. répétées : constantes.
Colette M.	6 mois	1 ^{re} —	+	+	+	+	d ^o
Odette G.	9 ans	4 ^e —	+	+	0	+	R. à L. 1/10 2 fois répé-
Charles G.	6 ans	1 ^{re} —	0	+	0	+	tées : 0 puis +.
Emile D.	3 mois	1 ^{re} —	0	0	0	+	R. à L. 1/10 2 fois répé-
André S.	2 ans	1 ^{re} —			0	+	tées : constantes.
Georges G.	5 ans	3 ^e —	+		0	d ^o	d ^o
Marcel T.	3 ans 1/2	2 ^e —	+		+		
Jeanne V.	3 ans	3 ^e —	+				
Claude R.	3 ans 1/2	2 ^e —	+				

NOMS	AGE	ÉMULSION	LYSAT N° 1	LYSAT N° 2	TÉMOIN	OBSERVATIONS
Madeleine M.	4 ans		++		++	R. « Méline » = 0.
Rose W.	2 ans		+		++	
Jacques M.	3 ans		0		++	
Albert L.	12 ans		+		++	
Jean D.	7 ans		0		+	
Léone H.	13 ans		0		0	
Rose W.	2 ans		++	+	+	
Lucienne Z.	3 ans		+			
Albert S.	4 ans		0	+		
Ida S.	1 an		0		+	
Christiane M.	3 ans 1/2	++		++		
Michelle C.	6 ans 1/4	++	+	++		
Jeanne S.	16 mois	++		++		
Marcel A.	2 ans	++	++	++		
Henri C.	9 mois	++		0		
Paulette L.	1 an	++		++		
Jacques B.	8 mois			++		
DILUTIONS	AGE	LYSAT 1/10	LYSAT 1/50	LYSAT 1/100	LYSAT 1/300	
Colette J.	7 ans	+				R. répétées : constantes. R. 3 fois répétées : constantes. R. echymotique pour Lysat à 1/300.
Paulette Z.	1 an	+				
Charles B.	9 mois	+				
Paul M.	5 ans	0	0			
Georges M.	8 ans 1/2	0	0	0	0	
Nicolle D.	5 mois		0	0	0	
Louis H.	7 ans			0	0	
François G.	4 ans 1/2		0	0	0	
Alphonse G.	15 mois		++			
Gloria G.	2 ans 1/2	+	++	+	+	

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Nous avons commencé nos essais par des injections intradermiques de bouillons filtrés B 10. Sur cette série seulement nous avons étudié l'évolution des réactions. En général, immédiatement après l'injection, se produit une réaction urticarienne autour du bouton dermique, réaction banale et dont il ne faut tenir aucun compte. La véritable réaction, lorsqu'elle est positive, débute 6 heures environ après l'injection : c'est une légère macule rose, mal limitée, de dimensions variables, entourée d'une fine aréole congestive; cette macule prend corps, s'étend, se colore plus vivement, la zone congestive périphérique s'accroît. En 24 heures, la réaction atteint son acmé. C'est alors une papule, plus ou moins rouge, plus ou moins étendue, dont la dimension varie de celle d'une pièce de 0 fr. 50 à celle d'une pièce de 5 francs. La base est indurée, elle s'est entourée d'une zone congestive très nette. Dans les heures qui suivent, la papule s'atténue, se décolore, s'affaisse pour disparaître en général au bout de 48 heures. Nous avons sur nous-mêmes, à différentes reprises, suivi l'évolution des phénomènes inflammatoires et toujours nous en avons noté le maximum 24 heures après l'injection. Toutes les lectures consignées sur nos tableaux ont été faites à ce stade.

La réaction s'avère donc, au premier chef, éphémère, quelle que soit son intensité. Rarement nous l'avons vu subsister après la quarante-huitième heure; toutefois, surtout quand les réactions étaient très fortes, ou si l'antigène employé était de concentration assez élevée, on a pu voir apparaître au bout de 2 jours une teinte ecchymotique persistant pendant quelques jours; nous avons noté cet aspect un peu spécial sur nos tableaux. Ce phénomène s'est produit en particulier avec le bouillon B 15 et l'émulsion forte de bacilles de BORDET.

Pour authentifier la spécificité de nos réactions, nous avons injecté,

en même temps que l'antigène, un témoin, constitué, comme nous l'avons dit plus haut, par le même produit, chauffé 1/4 d'heure à 100°. Comme on peut le constater en parcourant les résultats, ce témoin s'est révélé dans la plupart des cas aussi actif que le liquide non chauffé, parfois même plus actif. Pour expliquer cette action, nous avons d'abord supposé qu'elle était due à la constitution même du bouillon de culture : celui-ci contenant de l'ascite dont le chauffage coagulerait l'albumine en fines particules qui irriteraient mécaniquement le derme. Aussi avons-nous injecté à plusieurs de nos enfants du bouillon ascite vierge et ce même bouillon chauffé 1/4 d'heure à 100°. Or, presque jamais ces deux produits n'ont donné de réaction, sauf chez des sujets prédisposés, urticariens, eczémateux, que nous avons écartés de nos statistiques. De même, les enfants qui avaient réagi d'une manière intense à l'injection des antigènes coquelucheux n'ont eu aucune rougeur à la suite d'injection de mélitine, dont nous avons, à plusieurs reprises, jugé utile d'étudier les effets. C'est donc vraisemblablement l'albumine propre du bacille de BORDET qui est responsable de la réaction dans tous les cas.

Nous avons trouvé le même phénomène pour les lysats chauffés. Pour ceux-ci, nous avons employé par la suite, comme témoin, le sérum physiologique. Que conclure de cette constatation ? Existerait-il une exo-toxine du bacille de BORDET résistant à 100° ? Ou bien la réaction serait-elle due à des endotoxines contenues dans la préparation ? Cette dernière hypothèse semble la plus plausible, Elle est confirmée par la publication de J.-J. MILLER (22) qui, après avoir effectué différents travaux sur le bacille de BORDET, conclut : « Les substances antigènes du bacille de la coqueluche sont relativement thermostables, tandis que ses composés toxiques solubles sont inactivés à 37° ».

Quoiqu'il en soit, si les réactions positives n'existaient que chez des sujets en cours de coqueluche, à l'exclusion des autres, nous aurions eu tout lieu d'être satisfaits. Malheureusement la lecture des résultats des deuxième et troisième groupes (enfants non en cours de coqueluche) nous a montré des réactions positives très nombreuses, trop nombreuses pour pouvoir en déduire une différence essentielle avec les résultats du groupe 1. On note toutefois un pourcentage de réactions positives plus élevé dans le groupe des coquelucheux.

Chez les enfants de ce groupe, les bouillons filtrés B 10, B 15, B 20, B 30 ont donné, à part de rares exceptions, des réactions positives plus ou moins fortes : 82 sur 87, soit environ 80 %. Encore nous faut-il signaler que parfois des injections faites à quelques jours d'intervalle, dans les mêmes conditions, avec le même antigène, ont déterminé des réactions divergentes : elles se trouvaient par exemple négati-

ves au second essai, alors que 2 jours auparavant nous avons noté une réaction accentuée.

Dans le groupe N° 2, enfants n'ayant pas eu la coqueluche, l'intensité de la réaction n'a certainement pas été influencée par la possibilité de contamination. En effet, la rougeur cutanée a été souvent aussi intense chez des sujets sans aucun contact avec des coquelucheux que chez des enfants indemnes mais en contact journalier avec leurs frères atteints de coqueluche. De même, dans le groupe N° 3, sujets ayant eu la coqueluche, nous avons obtenu parfois des réactions très fortes chez des enfants ayant eu cette maladie depuis longtemps, des réactions très faibles ou négatives chez des sujets à peine convalescents.

Nous avons trouvé dans le groupe N° 2, 39 réactions positives sur 77, soit environ 50 % ; dans le groupe N° 3, 45 réactions positives sur 72, soit 60 %.

Quant aux essais effectués avec des dilutions de bouillons filtrés, de 1/10 à 1/50, s'ils donnent des réactions moins fortement positives, du moins ces réactions semblent-elles marcher de pair avec celles que donnent les solutions-mères. Les dilutions de 1/100 à 1/300 ont donné des phénomènes extrêmement faibles et fugaces ; elles ne doivent pas être retenues.

Nous avons enregistré des constatations analogues avec les lysats N°s 1 et 2 : 45 réactions positives sur 56 dans le groupe N° 1, soit 80 %. Dans le groupe N° 2, 20 réactions positives sur 30, soit 60 %. Dans le groupe N° 3, 14 réactions positives sur 24, soit 50 %. Ici encore, plusieurs injections répétées du même vaccin, faites à un même sujet, à une période déterminée de sa coqueluche, ont montré des réactions radicalement différentes. La dilution de lysat N° 2 au 1/10 paraît avoir donné des résultats plus intéressants : 20 réactions positives sur 23 dans le groupe N° 1, soit 86 %. Malheureusement, nous n'avons pas observé assez de cas, mais nous nous proposons de pousser plus avant nos essais. Les dilutions de lysat N° 2 du 1/50 à 1/300 ont une action beaucoup trop faible pour être retenues.

Nous n'avons fait qu'un très petit nombre d'injections avec l'émulsion de bacilles de BORDET. Elle nous a toujours donné des réactions très fortes et non spécifiques, semblable en cela au bouillon filtré B 15, chez tous les enfants coquelucheux ou non.

En dernier lieu, les résultats comparés des injections de bouillons filtrés et de lysats faites concurremment chez les mêmes enfants, à la même date, ont montré assez souvent des réactions dissimilaires. Parfois réactions fortement positives pour les bouillons, négatives pour les lysats, parfois, mais plus rarement, phénomène inverse.

En général, les bouillons filtrés ont produit des réactions beaucoup plus fortes et plus déconcertantes que les lysats.

En résumé :

1° Les réactions obtenues sont éphémères, maxima au bout de 24 heures, et disparaissent ensuite rapidement;

2° Les réactions sont à peu près semblables avec le vaccin pur et avec le vaccin chauffé à 100° pendant un quart d'heure;

3° Les injections de bouillon filtré B 15 et émulsion de bacilles de BORDET donnent toujours des phénomènes locaux très marqués et sont à rejeter;

4° Les réactions consécutives à l'inoculation des bouillons filtrés B 10, B 20, B 30, sont positives dans 80 % des cas dans le groupe N° 1, 50 % dans le groupe N° 2, 60 % dans le groupe N° 3; il existe une proportion beaucoup trop élevée des réactions positives dans les deux derniers groupes pour que l'on puisse utiliser ces bouillons pour fixer un diagnostic biologique;

5° Mêmes conclusions pour les lysats N° 1 et N° 2 dont la proportion de réactions positives est cependant plus élevée (80 %), quand on les injecte à des sujets en cours de coqueluche, que dans le cas contraire (50 à 60 %);

6° Les dilutions de bouillons filtrés de 1/10 à 1/50 donnent des réactions dans le même sens que les bouillons purs, quoique moins accentuées;

7° Les dilutions de bouillons filtrés de 1/50 à 1/300 sont trop faibles;

8° Les dilutions de lysat N° 2 de 1/50 à 1/300 sont trop faibles;

9° Seule la dilution de lysat N° 2 à 1/10 paraît donner des réactions plus probantes : 86 % de réactions positives chez les coquelucheux, réactions positives rares et faibles chez les non coquelucheux. Loin de nous cependant l'idée de conclure à la spécificité d'un produit qui ne s'est pas toujours montré fidèle, différant chez un même sujet à quelques jours d'intervalle et injecté à un nombre d'enfants beaucoup trop restreint. Cette constatation ne peut que servir de base à des essais ultérieurs.

En somme, et en cela nous sommes d'accord avec les auteurs qui, avant nous, ont fait des recherches analogues, il nous a été impossible, à l'heure actuelle, de provoquer par l'injection intradermique d'antigènes appropriés et très variés une réaction capable de déceler l'état de réceptivité d'un sujet à l'égard de la coqueluche.

CONCLUSIONS

Au cours de cette étude, nous avons comparé différents moyens de diagnostic biologique de la coqueluche : ensemencement sur milieu de BORDET des particules pharyngées expulsées au moment d'une quinte, réactions d'agglutination et de fixation du complément, injections intradermiques d'antigènes coquelucheux. Nous concluons ainsi :

1° La réaction d'agglutination permet d'identifier une souche de bacilles de BORDET à la condition que le sérum agglutinant soit de préparation récente et que les germes à l'étude aient été fraîchement isolés de l'organisme. Par contre, pour faire un séro-diagnostic, en mettant en contact une émulsion microbienne connue et un sérum de coquelucheux, la méthode est infidèle car le taux d'agglutination est souvent très faible, parfois nul;

2° La réaction de fixation du complément est valable. Mais elle apparaît tard, à partir de la quatrième semaine de la maladie. A ce moment, le diagnostic clinique est évident dans la plupart des cas. D'autre part, toute réaction de fixation est trop longue et délicate pour être retenue dans la pratique. On pourra y recourir dans certains cas de coqueluches frustes ou atypiques, pour dépister la maladie dans une famille ou une collectivité;

3° L'ensemencement des particules pharyngées projetées au moment d'une quinte sur milieu de BORDET en boîtes de Pétri est une recherche dont il est superflu de démontrer l'importance. C'est la seule méthode qui permette de faire un diagnostic précoce, avant l'apparition des quintes. Elle reste positive jusqu'à la troisième semaine, fixant à peu près à cette date la fin de la contagiosité. Grâce à cet examen, nous pouvons séparer, dès le début, les contagieux des sujets sains et traiter les malades à la seule période où l'action du vaccin puisse avoir quelque efficacité. On doit vulgariser cette pratique;

4° Les essais de réactions intradermiques effectués sur trois groupes

de sujets, enfants atteints de coqueluche, enfants n'ayant pas eu la coqueluche, enfants ayant eu antérieurement la coqueluche, ne nous ont pas donné jusqu'à présent de résultats satisfaisants. Nous avons utilisé parallèlement des bouillons filtrés de cultures ayant séjourné 10, 15, 20 ou 30 jours à l'étuve, des lysats vaccins, soit lysat sulfurique, soit autolysat par séjour des cultures à températures alternativement modérées et basses, enfin émulsion de bacilles de BORDET dans du sérum physiologique. Aucun de ces antigènes injecté dans le derme ne nous a permis de déterminer l'état de réceptivité ou d'immunité des sujets vis-à-vis de la coqueluche. Ce sont toutefois les lysats vaccins et, en particulier, l'autolysat dilué à 1/10 qui nous ont donné le moins de déboires. Ils autorisent quelque espérance et nous avons l'intention d'en poursuivre l'expérimentation.

VU : *Bon à imprimer :*
Le Président de la Thèse :

A. LEMIERRE.

VU : *Le Doyen de la Faculté :*
ROUSSY.

VU
et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris :

Pour le Recteur,
L'Inspecteur de l'Académie :

J. PERRON.

BIBLIOGRAPHIE

1. BORDET ET GENGOU. — Le microbe de la coqueluche (*Ann. Inst. Past.*, 1906, t. XX, p. 731. et 1907, t. XXI, p. 727).
2. BORDET. — *Bulletin de la Société Belge de Pédiatrie*, novembre 1935.
3. CHIEVITZ ET MEYER. — Recherches sur la coqueluche (*Ann. Inst. Past.*, octobre 1916, N° 10, p. 503).
— Laboratory test for Pertussis (*Acta Paediatrica, Stockholm*, I, p 99, 1921).
4. GIESE. — Recherches sur le bacille de Bordet et son apparition dans la coqueluche (*Ann. Inst. Past.*, novembre 1918, N° 11, t. XXXII, p. 522).
5. MADSEN. — Le diagnostic bactériologique de la coqueluche (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 1921, N° 8).
6. DEBRÉ-MARIE ET PRÉTET. — Les races de Bacilles de BORDET-GENGOU (*Soc de Biol.*, mars 1928).
— Le diagnostic biologique de la coqueluche, sa facilité, son intérêt (*Presse Médicale*, XXXVII, n° 2, p. 18, 5 janvier 1929).
— Le diagnostic bactériologique de la coqueluche et la vaccinothérapie anti-coquelucheuse (*Gaz. Méd. de France*, N° 2, p. 40-43, 15 janvier 1930).
7. KRUMWIEDE-MISHALOW-OLDENBASCH. — The existence of more than one type of bacillus pertussis (*Journ. inf. dis.*, N° 32, 1922-23).
8. KRISTENSEN. — Recherches sérologiques sur le bacille de la coqueluche (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 3 janvier 1927, t. XCVI, p. 358).
9. JOHN HAYS BAYLEY. — A medium for the isolation of bacillus pertussis (*Journ. inf. dis.*, t. LII, janvier-février 1933, p. 94).
10. GUNDEL ET SCHLUTTER. — Die serologie des keuschlusens (*Zeitch. f. Immunitätsf.*, t. LXXXI, 12 janvier 1934, p. 218).
— Bactériologie et sérologie de la coqueluche (*Klin. Woch.*, t. XII, N° 2, 21 octobre 1933, p. 1633).
11. KLEINSCHMIDT. — Der BORDET-GENGOUSCHE keuchstuenbacillus und der Pfeiffersche influensabacillus (*Klin. Woch.*, 10, 1847-1850, 30 octobre 1931).

12. DE VILLA ET MODIGLIANI. — Diagnosis of whooping-cough (*Pediatrics* 29 : 357, 15 avril 1921).
13. HULL ET NAUSS. — Intracutaneous reactions in pertussis (*Journ. Am. Med. As.* 80 : 1840-1841, 23 juin 1923).
14. ORGEL. — *Journ. Am. Med. As.*, 1922, t. 79, p. 1508-1509.
15. RIESENFELD. — Intracutaneous reactions in pertussis (*Journ. Am. Med. As.* 80 : 158-160, 20 janvier 1923).
16. A. LUBRANO. — Il valore del intradermoreazione nella pertosse (*Pediatrics*, 37, 237, 242, 1^{er} mars 1929).
17. CROPPER ET SEMADAR. — Observations on epidemic of whoopingcough at Lauwrence Royal Military School Sanawar with note of investigation of skin reaction in this disease (*Ind. Méd. Gaz.*, 271, 273, mai 1933).
18. MANUEL BLANC. — Traitement de la coqueluche par vaccination intra-dermique (*Arch. esp. de Péd.*, janvier 1932, p. 18).
19. NIELS ET KRARUP. — Réactions intra-cutanées dans la coqueluche. Expériences faites avec des émulsions et des autolysats de souches grises et vertes du coccobacille de BORDET-GENGOU (*C. R. de la Soc. de Biol.*, t. CXV, N° 1, 1934, p. 85).
20. OLGA POWITZKY. — Improved methods for the isolation of *Bacillus pertussis* (*Journ. of inf. Dis.*, 32, 1923).
21. JULIEN MARIE. — Recherches bactériologiques et immunologiques sur la coqueluche (*Thèse Paris*, 1928, Jouve et Cie).
22. J.-J. MILLER. — Experimental observations on the antigenetic potency of *H. pertussis* extracts (*Journ. of Im.*, t. XXVI, avril 1934, p. 427).
23. WILHELM BAYER. — Recherches sérologiques dans la coqueluche. Contribution à la vaccinothérapie (*Klin. Woch.*, t. 14, N° 9, 2 mars 1935, p. 301-303).
24. SIMON CHAGNAUD. — Vaccinothérapie de la coqueluche (*Thèse Paris*, 1930).
25. KRISTENSEN, SORENSSEN ET MEYER. — *Acta Pédiatria, Stockholm*, 25 octobre 1924.

